ストップトフロー分光光度計
（大塚電子 RA-401）

薬学部　薬品物理化学研究室　森　弘正；内線 4314

§１　はじめに

反応の速度論研究では反応によって起こる物質量の変化を経時的に観測する．物質量の変化は光吸収や蛍光など分光法や伝導度，pHの電気分析法，熱的方法，磁気共鳴法など間接的に検出されることが多い．通常の分光光度計などを使って測定できないような半減期数ミリ秒から数秒の速い反応の経時変化を測定するためにストップトフロー法が用いられる．ストップトフロー法で通常使われる検出法は光吸収や蛍光などの分光法である．

§２　原理

ストップトフロー法は２種の溶液を(i)急速に流れを開始し（ii）混合し，（ii）液の流れを停止し,記録開始（トリガー）信号を送出，（iii）反応セル内で進行する反応に伴う物理量を高速記録する．反応溶液の混合方式にはピストン駆動方式とガス圧駆動方式がある．本装置はガス圧駆動方式で，検出器として光吸収および蛍光検出器を備えている．ストップトフロー装置の概念図を下に示す．

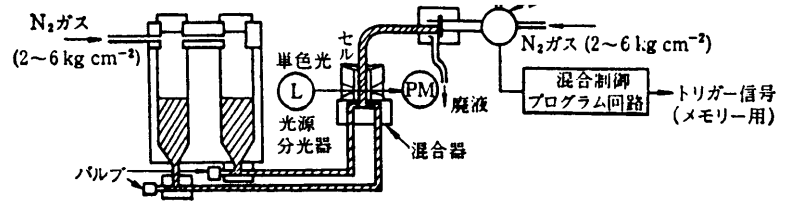
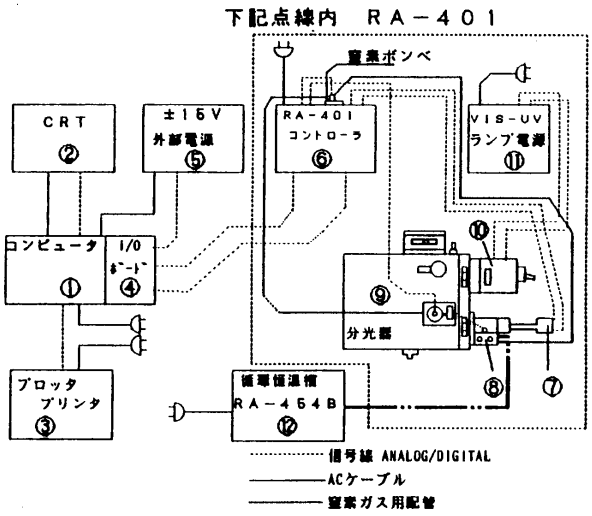


図１　ガス圧駆動方式のストップトフロー装置；流路系の概念図

§３　装置の仕様，付属設備

１）仕様　機種：大塚電子（株）RA 401型ストップトフロー分光光度計
RAコントローラ，ミキシングユニット，検出器(光電子増倍管)，光源，
RA分光器，コンピュータ(PC-9801)，プロッタ(MC-920)，循環恒温水槽
機能：測定波長範囲　200～800 nm
測定感度　0.0004 ΔOD
デッドタイム　約 500 μs（ガス圧　9 kg/cm^2　２mmセル使用）
使用セルとデッドボリウム　２mmセル（29.4 μL）10 mmセル（42.0 μL）

2）構成図



1.データ処理装置（PC-9801）　7.検出器（光電子増倍管PMT）

2.カラーCRT　8.ミキシング・ユニット

3.プロッタ/プリンタ（MC-920）　9.分光器（RA分光器）

4.I/Oボード（UI-020）　10.ランプハウス（VIS-UV）

5.±15V外部電源　11.VIS-UVランプ電源

6.RA-401制御器（コントローラ）　12.循環恒温槽（RA-454B）（オプション）

図２　RA 401型ストップトフロー分光光度計の構成図

本装置は大別して分光測定部（A），試料混合部（B），ＲＡコントローラ（C）およびデータ解析用コンピュータ（D）からなっている．

§４　測定方法

使用上の注意事項と測定手順（4-1．装置の起動，4-2．試料溶液のリザーバへの供給，4-3．試料溶液の追加と交換，4-4．測定，4-5．終了操作，4-6．基本的なデータの処理，の順に）を以下に述べる．なお，測定用セルは２mmと10mmセルが準備されており，通常は２mmセルが装置に取り付けられている．

４-１．装置の起動

1）通常の測定では窒素ガス圧を５ kg/cm^{2}とする

2）ランプ電源のVIS-UV電源スイッチをONにする（光源安定に30分間）

3）コンピュータのメインスイッチをONにし，プログラムディスク(RA-401S)をドライブＡに挿入する（詳しくは「4-4．測定」に記述）

4）RAコントローラ（本体）の電源をONにする
このとき，RAコントローラの各スイッチがつぎの状態にあることを確認する
[OPERATION]　OFF，[FLOW]　MANU，[PRESS]　OFFであるか？
[PM-VOLT]　つまみをL側にいっぱいにまわしてあるか？を確認する

6)　分光器ミラー切り換えレバーをＢ側（蛍光検出の場合はA側）とする
測定する波長によってフィルターを変える
スリット　1.4 mm（必要に応じてスリット幅を変える）

7)　測定波長を設定する（分光部のつまみで設定する）
ランプハウスの切り換えレバー選択：UV (200～350nm)　VIS (350～800nm)
測定波長によって切り換えプレートを選択しセットする

４-２．試料溶液のリザーバへの供給

1）リザーバのストップバルブ (R側とL側) を時計方向に回し閉める
2）[PRESS]スイッチをOFFにする
3）[FLOW]スイッチをAUTO→→MANU→→AUTOの順に切り換える（AUTOの確認）
4）[PRESS]スイッチがOFFになっていることを確認する
5）リザーバーの蓋（L側とR側）を外す
6）試料液をそれぞれリザーバに入れる（L側とR側に同量入れること）
　　{注意} 測定溶液は予めキャビテーションを防ぐためアスピレータなどで十分に脱気しておく
7）リザーバに蓋をする（時計方向に蓋を回しセット）
8）ストップバルブを時計と反対方向に回しいっぱい開く
9）[START]スイッチを数回押し，反応セルに反応後の溶液が満たされた状態にする
10）「４-４．測定」の作業に移る

４-３．試料溶液の追加と交換

［両方のリザーバの試料液の追加と交換］
測定試料の交換を以下の操作によって行なう
Ａ）蒸留水または緩衝液，測定溶液の溶媒で次に示す手順により洗浄する
1）[PRESS]スイッチをONにする
2）[FLOW]スイッチをMANUにする（リザーバに液があるときは液が排出される）
Ｂ）測定溶液を次に示す手順によりリザーバに入れる
1）[PRESS]スイッチをOFFにする
2）ストップバルブを時計方向にまわし閉じる
3）リザーバの蓋を開ける
4）リザーバに等量の試料液を入れる
　　試料の追加：ストップバルブを両方とも閉じ，[FLOW]スイッチをMANU→
　　→AUTOに切り換えた後，[PRESS]スイッチをOFFにしてからリザーバの蓋を開け，試料を入れる
5）リザーバの蓋を閉める
6）ストップバルブ（L側とR側）を開く
7）[PRESS]スイッチをONにする
　　もし，[FLOW]スイッチがAUTOに切り換えてないと試料液はすべて排出されるので必ず[FLOW]スイッチをAUTOにしておくこと
8）測定できる状態となる
［リザーバの一方だけの試料液の追加と交換］
1）交換しない方のストップバルブだけを閉めたのち，[FLOW]スイッチをMANUにする
2）[FLOW]スイッチをAUTO，[PRESS]スイッチをOFFにしてＡ）で述べた方法で交換するリザーバの試料液を排出し蒸留水または緩衝液，測定溶液の溶媒で洗浄

する
3）ストップバルブを閉じ，交換する試料液を少し多めに入れる
4）リザーバの蓋を閉める
5）[PRESS]スイッチをONにする
6）ストップバルブを開ける
7）L側とR側の液量に違いがあるとき，スタートスイッチを押して同じ液量までにする．[DURATION]を小さくすると微調整ができる
8）交換しなかった方のストップバルブを開く
9）測定できる状態となる

［試料液の追加と交換での注意］
1）リザーバの蓋はL側とR側で間違えて取り付けないこと
2）試料量はL側とR側で必ず同量にすること
3）試料を追加するときはストップバルブを必ず閉じて行うこと

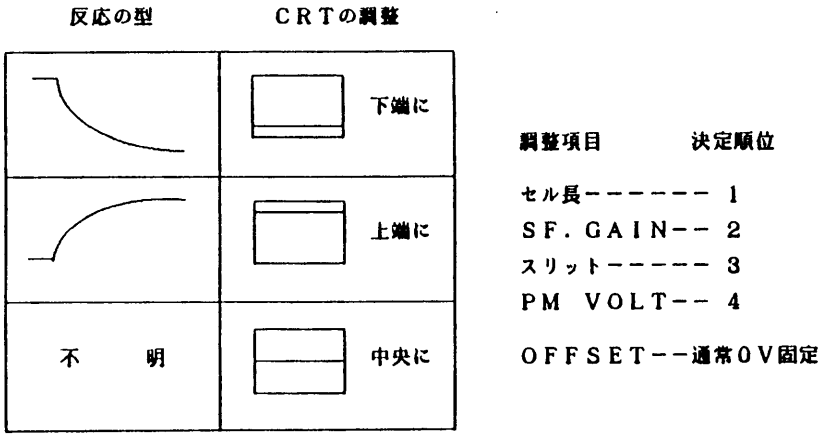
4-4　測定

1）コンピュータは「4-1．3）」で既に立ち上げられており，CRT画面は"How many files (0-15)?"の表示となっている．リターンキーを押す

<初　期　画　面>

```
*****  S T O P P E D   F L O W  *****                    SF [SF-01A]

[0]: T e s t                        [10]: Samp.period        = 300 msec

[2]: M e a s u r e                  [11]: S F - G a i n       = .2 ABU
[3]: M e a s u r e (auto. accum.)
            A c c u m .      =0
                                    [13]: W a v e l e n g t h  = 550 nm
[5]: A c c u m .   c l e a r       [14]: S l i t             = 1.4 nm


                                    [19]: S a v e  condition
[9]: C a l c u l a t i o n          [E] : E n d

Select [0] --- [E] ?
```

2）コンピュータの画面の[0]Testを選択し
3）分光部の波長つまみを回して測定波長をセットし，下部のレバーを左に倒してロックする．[スリット]は1.4 nm とする．RAコントローラの[GAIN]を 1 V/FS にセットする．
4）[OPERATION]スイッチをONにする
5）CRTをみながら[PM-VOLT]つまみをhigh方向へまわしベースラインレベルを吸光度が増加する反応では上側へ，反対の場合は下側へくるようにフォトマルチプライヤーの印加電圧を調節する
6）作業が終了したら[SPACE]バーを押し初期画面に戻る
7）データ解析コンピュータで[２]または[３]を入力すると次の画面が表示される
[３]では加算平均する回数を入力する



8）保存したいチャンネル番号を入力すると，"Sample name ?＿＿＿＿＿＿と表示されるので10文字までの保存名を入力すると次の画面が表示される
（数字，アルファベット，カナまたは記号で入力できる）

```
*****  S T O P P E D  F L O W  *****                    SF [SF-01A]

[0]: D i s p l a y                    [10]: CH.A + B -> CH.C
                                      [11]: CH.A + CH.B -> CH.C
                                      [12]: CH.A - CH.B -> CH.C
[3]: Y - S c a l e                    [13]: CH.A  <->  CH.C
          = 0 --- .2 ABU              [14]: CH.A (average) -> CH.C

[4]: T i m e   S c a l e              [15]: Smoothing , Differential
                  = 0 --- 300 msec

[6]: W r i t e    d i s k             [17]: L o g   p l o t
[7]: R e a d      d i s k             [18]: Guggenheim  plot
[8]: D e l e t e  d i s k             [19]: C u r v e   f i t

[9]: CH.A ( rename : B ) -> CH.A      [RETURN] : M e n u

Select  [0] --- [RETURN]  ?

CH  ＳＡＭＰＬＥ　ＮＡＭＥ    CH  ＳＡＭＰＬＥ　ＮＡＭＥ    CH  ＳＡＭＰＬＥ　ＮＡＭＥ    CH  ＳＡＭＰＬＥ　ＮＡＭＥ
 1                          21                          41                          61
 2                          22                          42                          62
 3                          23                          43                          63
 4                          24                          44                          64
 5                          25                          45                          65
 6                          26                          46                          66
 7                          27                          47                          67
 8                          28                          48                          68
 9                          29                          49                          69
10                          30                          50                          70
11                          31                          51                          71
12                          32                          52                          72
13                          33                          53                          73
14                          34                          54                          74
15                          35                          55                          75
16                          36                          56                          76
17                          37                          57                          77
18                          38                          58                          78
19                          39                          59                          79
20                          40                          60                          80

ＳＡＭＰＬＥ　ＮＯ. ([ RETURN ] : 1   or   1 --- 80 )  ?
```

9）RAコントローラの[START]スイッチを押し，反応を開始する
（測定中は"Trig. Switch"が表示，転送中は"Wait"が表示される）
10) 再び[START]スイッチを押す．濃度変化の曲線が得られる．そのまま測定を終了するか，続けるか，データ保存後終了するか，を聞いてくる
[RETURN]：End　[SPACE]：Next　[4]：Ch. in & End　から選択

通常は，この結果から

記録時間	コンピュータで設定
信号強度	GAIN で変える．目盛り(V/FS)を大きくすると感度が大きくなる
終了後の曲線の位置	[PM-VOLT] で赤色の範囲内で変える
ノイズ	[RESPONSE]で変える．ただし記録時間の 1/100 以下にする
記録の初期の乱れ	[DELAY]で変える．これはバルブ停止命令信号とデータ取り込みトリガー信号の間の遅延時間である
全体の乱れ	[DURATION] で変えられるときもある．これは電磁弁の開いている時間であり，大きくすると試料の消費量が大きくなる

を調節し，最適の結果が得られるまで [End]として一旦戻り，測定波長，SF-GAIN，スリット幅などを入力しなおし，[Next]を選択して測定を繰り返し満足する結果が得られたら[Ch. in & End] を選択する
11）測定結果のデータ処理，フロッピーディスクへのデータの保存，および印刷は「４-６．データの処理と印刷」に記述するので参照する

４-５．終了操作

測定を終了する場合の操作手順を以下に示す
1）プロッタ／プリンタの電源スイッチをOFFにする
2）コンピュータの操作
①CRTに表示された初期画面で，[E]を押す
②フロッピーディスクドライブ装置が点滅し，CRTに”A＞”が表示される
③フロッピーディスクを取り出す
④コンピュータの電源スイッチをOFFにする
3）VIS-UVランプ電源の電源スイッチをOFFにする
4）リザーバおよび光学セル，試料混合器の洗浄およびＲＡコントローラのスイッチの設定
①[PM-VOLT]をＬ方向に回し，ＨＶメーターの表示を0Ｖにする
②[FLOW]スイッチをMANUにする（リザーバ内のサンプルがすべて排出される）
③再び[FLOW]スイッチをAUTOにする

④ストップバルブを両方共閉じる
⑤[PRESS]スイッチをOFFにする
⑥リザーバ蓋を開き，溶媒または蒸留水を５mL入れる
（有機溶媒で洗浄した場合は最後に蒸留水で洗浄する）
⑦リザーバ蓋を閉じる
⑧[FLOW]スイッチをAUTOにした後，MANUに戻す
⑨ストップバルブを両方共開く
⑩ＲＡコントローラの[PRESS]スイッチをONにする（リザーバ内のサンプルが加圧されセル内へ流される）
⑪[FLOW]スイッチをMANUにする（リザーバ内のサンプルがすべて排出される）
⑫③～⑩を2～３回繰り返えし，リザーバ，試料混合器を洗浄する
⑬再び[FLOW]スイッチをAUTOにする
⑭ストップバルブを両方閉じる
⑮[PRESS]スイッチをOFFにする
⑯[FLOW]スイッチをMANUにする
⑰[OPERATION]をOFFにする
⑱ＲＡコントローラの[POWER]スイッチをOFFにする

5）窒素ガスの一次圧，二次圧を止める
6）外部電源ボックスの電源スイッチをOFFにする

４-６．データの処理と印刷

・フロッピーデイスクへの保存と読み込み
・データ保存のチャンネル間の移動とチャンネル間で加減したデータの作成
・log プロット，Guggenheimプロット，Curve Fitなどのデータ処理ができる

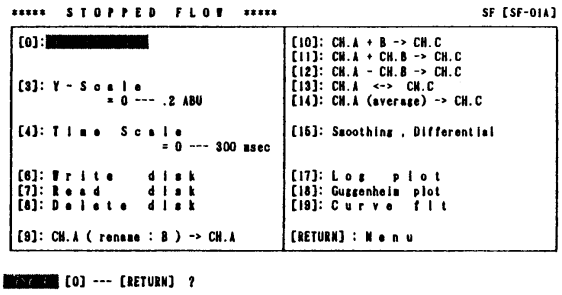
[測定データの読み込みと印刷]

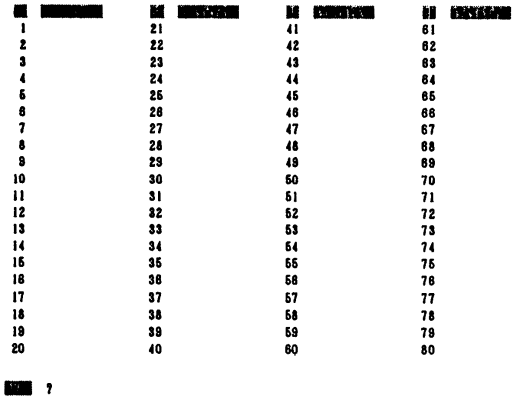
＊読み込んだデータのABUスケールと時間スケールに合わせて測定時のスケールをコンピュータで入力することを忘れずに！

1）初期画面で[9]を選択すると解析演算画面が表示される

```
*****  S T O P P E D   F L O W  *****                    SF [SF-01A]

[0]: D i s p l a y                    [10]: CH.A + B -> CH.C
                                      [11]: CH.A + CH.B -> CH.C
                                      [12]: CH.A - CH.B -> CH.C
[3]: Y - S c a l e                    [13]: CH.A  <->  CH.C
          = 0 --- .2 ABU              [14]: CH.A (average) -> CH.C

[4]: T i m e   S c a l e              [15]: Smoothing , Differential
                  = 0 --- 300 msec

[6]: W r i t e    d i s k             [17]: L o g    p l o t
[7]: R e a d      d i s k             [18]: Guggenheim  plot
[8]: D e l e t e  d i s k             [19]: C u r v e   f i t

[9]: CH.A ( rename : B ) -> CH.A      [RETURN] : M e n u

Select  [0] --- [RETURN]  ?
```

2）[0]を入力するとチャンネルリストが表示される





3）読み込むチャンネル番号を入力する

チャンネル指定は”，(and)”または”－(from to)”，”－”を使って複数同時に読み込める

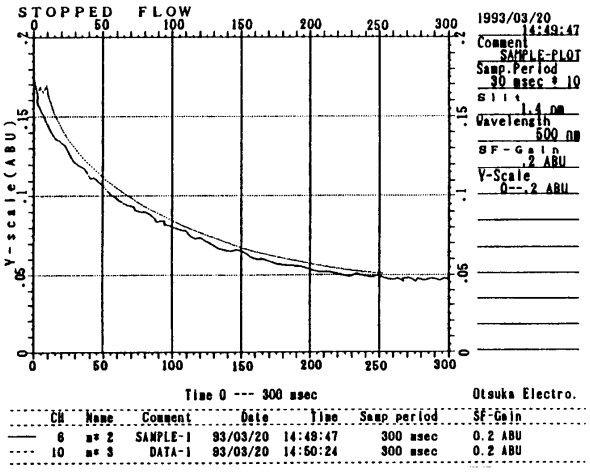
ABUスケールと時間スケールが測定時のスケールと同じであることを確認する．もし違っているときは初期画面に戻り，測定時の[10]SAMPLE PERIOD, [11]SF-GAIN，[13]WAVELENGTH，[14]SLITを入力したのち，[9]を選択し，チャンネルを呼び出す

4）[RETURN] Next　[0] Plot　[1] Copy　[2] Digital　から選択する

印刷は[0]，[1]または [2] を選択するとComment？＿＿＿＿に１５文字以内で入力すると印刷が開始される

もし，コメントを入力せずにリターンキーを押すと＜Calculation＞画面に戻る

［0］プロット出力例



［2］デジタル出力例

CH 6

Sample name	n= 2	Date	93/03/20	Time	14:49:47
Samp.period	20 msec * 10	Slit	1.4 nm		
0 ms	0.1783	80 ms	0.07976	160 ms	0.05525	240 ms	0.04988
10 ms	0.1635	90 ms	0.07379	170 ms	0.05450	250 ms	0.04911
20 ms	0.1421	100 ms	0.06973	180 ms	0.05317	260 ms	0.04839
30 ms	0.1252	110 ms	0.06655	190 ms	0.05188	270 ms	0.04876
40 ms	0.1122	120 ms	0.06286	200 ms	0.05118	280 ms	0.04774
50 ms	0.1008	130 ms	0.06078	210 ms	0.05149	290 ms	0.04782
60 ms	0.09138	140 ms	0.05879	220 ms	0.05090	300 ms	0.04325
70 ms	0.08531	150 ms	0.05693	230 ms	0.04956		

CH 10

Sample name	n= 2	Date	93/03/20	Time	14:50:24
Samp.period	20 msec * 10	Slit	1.4 nm		
0 ms	0.1773	80 ms	0.07836	160 ms	0.05611	240 ms	0.05007
10 ms	0.1651	90 ms	0.07424	170 ms	0.05330	250 ms	0.04387
20 ms	0.1441	100 ms	0.07008	180 ms	0.05357	260 ms	0.04370
30 ms	0.1288	110 ms	0.06600	190 ms	0.05228	270 ms	0.04386
40 ms	0.1123	120 ms	0.06372	200 ms	0.05153	280 ms	0.04868
50 ms	0.1020	130 ms	0.06078	210 ms	0.05057	290 ms	0.04836
60 ms	0.09313	140 ms	0.05868	220 ms	0.05043	300 ms	0.04849
70 ms	0.08540	150 ms	0.05687	230 ms	0.05044		

［測定データのフロッピーデイスクへの保存］

5）フロッピーデイスク(MS-DOSでフォーマット)をドライブＢに入れ[6]を入力する

6）Select (A, B, C, D)　が表示されるので”B”を選択する

7）”File name？”が表示されるので８文字までの名称を入力する

8）チャンネルリストと”No. (write)？”が表示されるので書き込みたいチャンネル番号をキー入力すると書き込みが行われ”Wait !!!”表示の後自動的に＜Calculation＞画面に戻る

9）さらに書き込みたいときはこの作業を繰り返す
10）作業が済んだらリターンすると初期画面に戻る

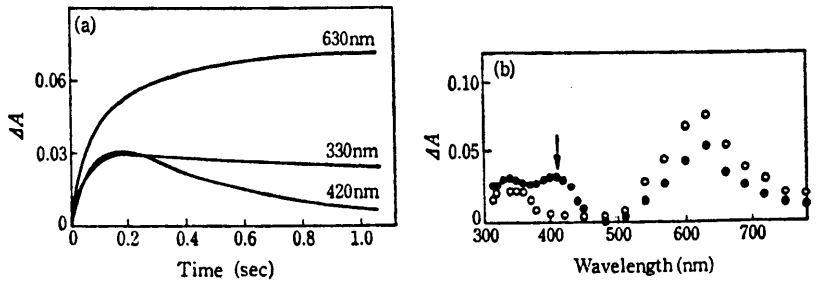
[測定データのフロッピーデイスクからのデータの読み込み]

1）フロッピーデイスクをドライブＢに入れ[7]を入力する
2）Select (A, B, C, D)　が表示されるので ”Ｂ” を選択する
3）”File name？” が表示されるので呼び出すFile nameを入力する
4）チャンネルリストと ”No. (read)？” が表示されるので書き込みたいチャンネル番号をキー入力すると書き込みが行われる
そのままリターンすると＜Calculation＞画面に戻るので,
5）［測定データの読み込み］の2），3）に従ってデータを読み込むとCRT画面に結果が表示される

§５　応用例

金属錯体形成反応，生体高分子の立体構造や酵素反応など高速液相反応の研究に応用される．

還元型セルロプラスミンのO_2による酸化過程での吸収スペクトル変化をストップトフロー法で測定されている．図ａでみられるように420 nmの曲線が0.2秒で極大をしめして減少している．この極大と反応が完結した２秒での吸光度と反応開始直後の吸光度との差DAを波長に対しプロットしたのが図ｂである．　これらの図から420 nmに反応中間体が生じていることが示されている．（T. Manabe, M. Manabe and H. Hatano, *FEBS Lett.*, 23, 268 (1972).）



ストップトフロー法による吸収スペクトル変化の追跡．還元型セルロプラスミンのO_2による酸化過程[50]．（ａ）330, 420, 630 nm における反応曲線（吸収変化）．（ｂ）反応開始より 0.2 sec（●）および 2 sec（○）後におけるスペクトル変化，矢印は反応中間体の吸収極大を示す．その消長は（ａ）の 420nm の曲線で示される．反応条件：セルロプラスミン 1.47×10^{-5} M, O_2 1.20×10^{-4} M, pH 5.5, 25℃.
文献 50 (North-Holland Publishing Co.) より．

図３ストップトフロー法による還元型セルロプラスミンの酸素による酸化過程の測定

参考書

1）廣海啓太郎：酵素反応解析の実際，講談社サイエンティフィック，1989.
2）大野素徳，崎山文夫，高橋健治：酵素実験法Ⅰ，広川書店，1993.
3）大塚電子（株）ストップトフロー分光光度計取扱説明書から基本的測定方法を

まとめた.